

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu penelitian deskriptif. Metode deskriptif adalah metode yang menggunakan data yang diperoleh secara langsung tanpa memerlukan analisis yang luas atau kesimpulan untuk menggambarkan atau mengkarakterisasi subjek penelitian (Sugiyono, 2019). Penelitian deskriptif juga bertujuan untuk menguraikan fakta-fakta atau sifat-sifat yang berhubungan dengan fenomena yang diteliti (Nazir, 1988). Penelitian ini mendeskripsikan pasangan primer yang diamplifikasikan dengan gen HSP70 ayam kate untuk melihat polimorfisme gen HSP70 *Gallus gallus*.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama kurang lebih empat bulan dari bulan Februari sampai dengan Mei 2023. Lokasi penelitian yaitu di laboratorium Riset, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Proses *sequencing* sampel hasil amplifikasi PCR DNA ayam kate dilakukakn oleh First BASE Laboratory, Selangor, Malaysia.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini yaitu ayam lokal kate dengan 10 sampel DNA ayam kate koleksi Aryani *et al.* (2019) yang kemudian dipilih tiga sampel terbaik untuk proses *sequencing*. Penelitian ini juga menggunakan urutan sekuens gen HSP70 *Gallus gallus* dari genbank NCBI sebagai sekuens referensi dan pembanding dengan kode akses no J02579, AY143691, AY143692, dan AY143693 (Gambar 3.1) karena memiliki potensi kemiripan pada gen HSP70 *Gallus gallus*.

1 ttgtgattgg ctgaggggag tggcgcagcg tagaaagcga gacggatcga gaaaaaacag

F1

61 gaagaagccc gatctggctg caatctacgg gagaggggtg ggctagagag tggggcgtac
121 gcttctgatt gggcaggagg caaggggocg gcgctcttcg gctagtcocg gaggcggatt
181 cggtaactg cggcagtcg gtgtctggat tggtocttag cgttctggca gtttccagaa
241 gaaggctaag cggactataa agagggcgcg acggccgtaa cggcagatcg gcgccagac
301 agcagcgaga agcgggocgga ggagacgtga ctgcgagcga gcaagtgact ggcggagcga

Start codon

361 gtggctgact gaccaagag aatctatcat catgtctggc aaagggccg ccatcgcat
421 cgatctgggc accacgtatt **PRIMER 1** ctggtctccg catggcaag tggagatcat
481 tgccaacgac caggggaacc ccatcaaacctcgt gccttcaccg atacagagcg
541 cctcatcggg gatgctgcca agaaccaagt ggcaatgaac cccaccaaca ccatcttga
601 tgccaagcgt ctcatcggcc gcaagtatga tgacccaca gtgcagtcag acatgaagca
661 ctggcccttc cgtgtggtga acgaggggtg caagcccaag gtgcaggtg actacaagg

F2

721 tgagatgaag accttcttc cagaggagat cagctctatg gtgctcacca agatgaagga

R1

781 gattgctgag gcctatctgg gaaaaaaggt agagactgct gttatcacag tgcccgctta
841 cttcaacgac tcccagcgcc aggccacca agatgctggc accatcactg ggcttaacgt
901 gatgctgatt atcaatgagc ccacagcagc tgctattgcc tatggcttgg ataagaaagg
961 taccggggct ggagagaaga atgtgctcat ctttgacttg ggaggggca cttttgatgt
1021 gtccatcctt accattgagg atggcatctt tgaggtgaag tccacagctg gggacacca
1081 cctaggtggg gaggactttg acaaccgcat ggtaaacctg tttgtagaag agttcaaggg
1141 taagcacaag cgtgacaatg ctggcaataa cggagcagtg aggcgtctgc gtacagcttg
1201 tgagagggcg aggcgtatct **PRIMER 2** ctggcaataa agcattgaga ttgactcct
1261 ctttgagggc attgacttct acacctccat cactcgtgcc cgctttgagg aactcaatgc
1321 tgatcttttc cgtggtacct tggagccagt ggagaaggcc ctgctgtatg ccaagcttga
1381 taagggccag atccaggaga ttgtgcttgt ggggggctcc actcgtattc ctaagatcca
1441 gaagttgctg caagatttct tcaatggcaa agagctgaac aagagcatca atccagatga
1501 agctgttgcg tatggtgccc ctgtgcaagc agctatcctc atgggagaca agtctgaaa
1561 tgtgcaagat ctgctcctgt tggatgtcac cccctgtcc ctgggcatcg agacagctgg
1621 tggagtgatg actgctctca tcaagcgtaa caccaccatt cccaccaaac aaacacagac

R2 **F3**

1681 cttcaccacc tactcagaca accagagcag tgtcctcgtc caggtgtatg aaggtgagag
1741 ggctatgaca aaggacaaca acttgctggg caagtttgac ctaacaggca tccccccggc
1801 accccgtgga gttcctcaga tcgaggtcac ttttgacata gatgctaag gtatcctgaa
1861 cgtcagtgct gtggacaaga gtacagggaa ggagaacaag ataaccatca ccaatgaca
1921 gggtcgcctt agcaaatgag atatgaccg tatggtacaa gaagcagaga aatacaaaagc
1981 agaggatgaa gccaacagag ataggggtgg agccaagaac tcccttgagt cgtatactta
2041 caacatgaag cagacagtgg aggatgagaa actgaaggga aagatcagtg accaggaca
2101 gcagaaagtg ctgcacaagt gccaggaggt gatcagttcg cttgaccgaa accagatggc
2161 agagaaagaa gagtatgag **PRIMER 3** ctgcacgaa agagctggag aaactctgca acccgattgt
2221 cacaaaactg taccaggcag ctgcacgaa agagctggag ggctccggtg gccaaccat

Stop codon

2281 tgaagaagta gattaaaaag actcttaaac tatagactgg tttatggaca gtcactccat
2341 tctttgcttt atattttttt ctaacgttta aggaaaaacg tcattgcaa taacagagtt
2401 tattctggtg ggtgtgtata aaggcaaatc taccagcttg tggttttgat aaaaggaag
2461 gcacgtcctg ctttataagg ttagtaatag acaagttttg ttaattcaga tacagctcct
2521 tgtattctgg atgtttctct ctgtttaaat gtctcttcta aagtaaccac tcgactggtg

R3

2581 cagttgacaa gtttcaagtt atgctaggaa aaaaaaac tttgaaaga tgagaaatgc
2641 caagtgcgc ttctggaaat tttggtaata aataaaattt atttgggat cc

Gambar 3. 1 Amplifikasi Gen HSP70 Ayam Lokal Indonesia Berdasarkan Sekuens *Gallus gallus* J02579 dengan Primer 1, 2 dan 3

(Dok. Aryani, 2019)

3.4 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2.

Tabel 3.1 Alat yang Digunakan

No.	Nama Alat	Jumlah
1.	Mikropipet 0.5-10 μ l	1 unit
2.	Mikropipet 2-20 μ l	1 unit
3.	Mikropipet 20-200 μ l	1 unit
4.	Tip Putih	1 pack
5.	Tip Kuning	1 pack
6.	Tube 0.2 ml	1 pack
7.	Tube 1.5 ml	1 pack
8.	<i>Vortex</i>	1 unit
9.	<i>Centrifuge</i>	1 unit
10.	Rak tube	3 unit
11.	Mesin PCR	1 unit
12.	Spektrofotometer Nanodrop	1 unit
13.	Botol duran 1 L	2 unit
14.	Botol duran 250 ml	3 unit
15.	<i>Hotplate</i>	1 unit
16.	Mesin Elektroforesis	1 unit
17.	Cetakan <i>Well</i>	1 unit
18.	<i>Transimulator UV</i>	1 unit
19.	Sarung Tangan Medis	1 unit
20.	<i>Freezzer</i>	1 unit
21.	Plastik antipanas	1 pack
22.	Parafilm	1 pack
23.	Lakban kertas	1 unit
24.	Laptop	1 unit
25.	Software Bioedit	1 apk
26.	NCBI Primer-BLAST	1 apk
27.	Software MEGA	1 apk

Tabel 3. 2. Bahan yang Digunakan

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	DNA Koleksi Ayam Kate	10 unit
2.	Go Taq Green Master Mix	2 unit
3.	Primer (<i>Forward & Reverse</i>)	6 unit
4.	Bubuk Agarosa	1 toples
5.	<i>Gel red</i>	1 unit
6.	<i>Loading dye</i>	1 unit
7.	Air Steril (ddH ₂ O)	3 unit
8.	Tris Boric EDTA (TBE) 10x	1 Liter
9.	<i>Aquadest Steril</i>	2 Liter

3.5 Prosedur Penelitian

Tahap persiapan dan tahap penelitian merupakan dua langkah yang membentuk prosedur dalam penelitian ini. Tahap penelitian diantaranya mengumpulkan rancangan desain primer, amplifikasi PCR, elektroforesis, *sequencing*, serta analisis data.

3.5.1 Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan untuk penelitian disiapkan dan dipastikan tidak terkendala. Alat yang sudah tersedia dibersihkan terlebih dahulu sebelum dipakai, disimpan atau ditutup dengan kertas dan disterilisasikan menggunakan autoklaf selama 20 menit dalam suhu 121°C yang bertujuan untuk menghindari kontaminasi sekitar.

3.5.2 Desain Primer

Rancangan primer yang digunakan untuk penelitian ini yaitu dari Aryani *et al.* (2019), Fauziah (2022) dan Hanifa (2022). Primer yang sudah ditentukan selanjutnya dikirim ke pihak First BASE untuk dilakukan *sequencing*.

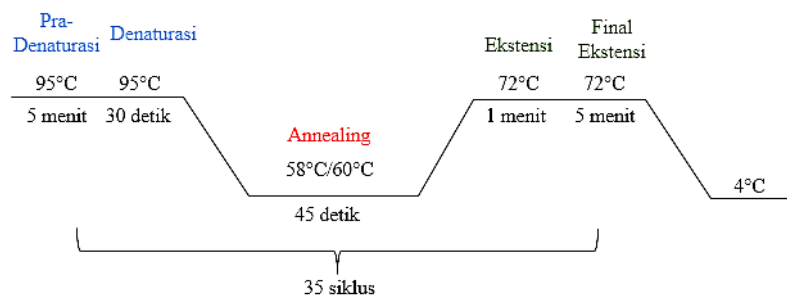
Tabel 3. 3. Pasangan Primer dan Suhu *Annealing*

No.	Primer	Suhu Annealing	DNA Target
1.	F1. 5'-CGATCTGGCTGCAATCTACG-3' (20) R1. 5'-CTGGGAGTCGTTGAAGTAAGCG-3' (22)	60°C	787bp
2.	F2. 5'-GGTGCTCACCAAGATGAAGG-3'(20) R2. 5'-TGGACGAGGACACTGCTCTG-3'(20)	60°C	963bp
3.	F3. 5'-CTCGTCCAGGTGTATGAAGG-3'(20) R3. 5'-TGCACTTGGCATTCTCATC-3'(20)	58°C	934bp

3.5.3 Amplifikasi PCR Ayam Kate

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dengan masing-masing pasangan primer *forward* dan *reverse* pada setiap sampel untuk mendeteksi titik polimorfisme. Target dalam amplifikasi PCR dalam gen HSP70 mencakup daerah promotor, 5'UTR, *coding*, dan 3'UTR. Pertama-tama disiapkan primer yang akan diujikan dan DNA stock sampel ayam kate. Bahan untuk campuran PCR terdiri dari 12.5 µl GoTaq Green Master Mix yang mengandung 2x reaksi GoTaq Green, 8.5 µl ddH₂O, 1 µl dari masing-masing

primer *forward* dan *reverse*, 2 μ l DNA template, sehingga volume akhir menjadi 25 μ l. Pada PCR telah diatur program (Gambar 3.2) yang terdiri dari denaturasi awal dengan suhu 95°C selama 5 menit, kemudian denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 60°C (pada primer 1, primer 2) dan pada suhu 58°C (pada primer 3) selama 45 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit, dan terjadi selama 35 siklus. Proses amplifikasi ini diakhiri oleh ekstensi pada suhu 72°C selama 5 menit.



Gambar 3. 2 Diagram Program PCR

(Dok. Pribadi, 2023)

Amplifikasi gen HSP70 dilakukan dengan menggunakan mesin PCR dengan prinsip dasar sintesis DNA *in vitro* secara bireksional berlangsung melalui ekstensi pada sepasang primer *forward* dan *reverse* yang dirancang sesuai urutan nukleotida dari kedua rantai DNA yang diamplifikasi. Alat yang digunakan pada tahap ini berupa tube 0.5 μ l, mikropipet dengan tip kuning dan putih untuk membuat mix PCR. Kemudian homogenkan hasil campuran mix PCR dengan menggunakan vortex.

3.5.4 Elektroforesis

Proses elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarosa 1%-2%, yang diwarnai dengan *Gel red* sesuai volume agarosa. Pembuatan gel agarose 1%, dengan volume 100 ml dapat dilakukan sebagai berikut: 1 gram bubuk agarosa ditimbang, kemudian bubuk agarosa dimasukkan ke dalam botol durham. *Buffer* TBE1X dimasukkan sebanyak 100 ml dan dihomogenkan terlebih dahulu hingga tidak adanya sisa bubuk agarosa yang menempel di atas permukaan botol. Botol yang telah terisi bubuk agarosa dan *buffer* dipanaskan di atas *hot plate* sampai

agarosa larut dan terlihat warna gel yang bening, kemudian diangkat dan diamkan sampai suhu agarosa hangat-hangat kuku. Pewarna *Gel red* ditambahkan sebanyak 3 μ L dan dihomogenkan secara perlahan. Apabila agarosa sudah hangat, gel agarosa dituangkan pada cetakan gel agarosa kemudian di tunggu sampai agarosa membeku sempurna diatas cetakan, sehingga dapat digunakan. Selanjutnya untuk *running* elektroforesis, pertama alat elektroforesis disiapkan dan dipasang wadah sesuai kutub listrik positif dan negatifnya dan pastikan tidak terbalik. *Buffer* TBE 1X dituangkan ke dalam wadah (alat elektroforesis) sampai bisa merendam agarosa (kurang lebih 500 ml), lalu gel agarosa yang usdah terbentuk diletakkan pada wadah dan pastikan sudah terendam larutan *buffer* TBE 1X. Selanjutnya untuk uji kualitatif DNA, maka sampel yang dimasukan ke dalam sumur harus sudah tercampur dengan loading dye (Promega) dengan formulasi atau perbandingan sampel DNA dan *loading dye* 5:1, sehingga total yang masuk ke dalam sumur 6 μ l. Memasukan sampel ke dalam sumur dapat menggunakan alat mikropipet dan tip putih. Tahap terakhir *running* dengan waktu 20-25 menit untuk volt 100, dan 30-90 menit untuk volt 50. Namun, sampel hasil amplifikasi PCR yang dilakukan uji elektroforesis, maka jumlah sampel yang dimasukan sebanyak 3-5 μ l. Ketentuan keberhasilan pada amplifikasi PCR menggunakan alat elektroforesis, sebagai berikut: terlihat pita DNA, ukuran pita pada amplicon sesuai dengan target yaitu 787, 934, 963 bp, dan pita DNA tidak smear (dapat dilihat dibawah lampu UV).

3.5.5 Sequencing

Dilakukan *sequencing* tiga sampel (H6, H7, H10) terbaik dari sepuluh sampel DNA ayam kate dengan paket pengurutan siklus terminator bigdye ABI® PRISM v3.1 melalui First BASE Laboratories yang terletak di Selangor, Malaysia.

3.6 Analisis Data

Hasil *sequencing* DNA ayam kate dilakukan analisis menggunakan software Bioedit versi 7.0.4.1 dan software MEGA versi 10.

3.6.1 Bioedit

Hasil *sequencing* dilakukan pembuatan consensus menggunakan *software* Bioedit versi 7.0.4.1 dengan cara menggabungkan (*contig*) sekuens hasil

sequencing forward dan *reverse* yang bertujuan pengolahan data setiap basa konsensusnya dianalisis dengan melihat puncak (*peak*) pada hasil *sequencing*. Data sekuens yang diperoleh disimpan dalam format FASTA pada aplikasi Notepad.

3.6.2 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

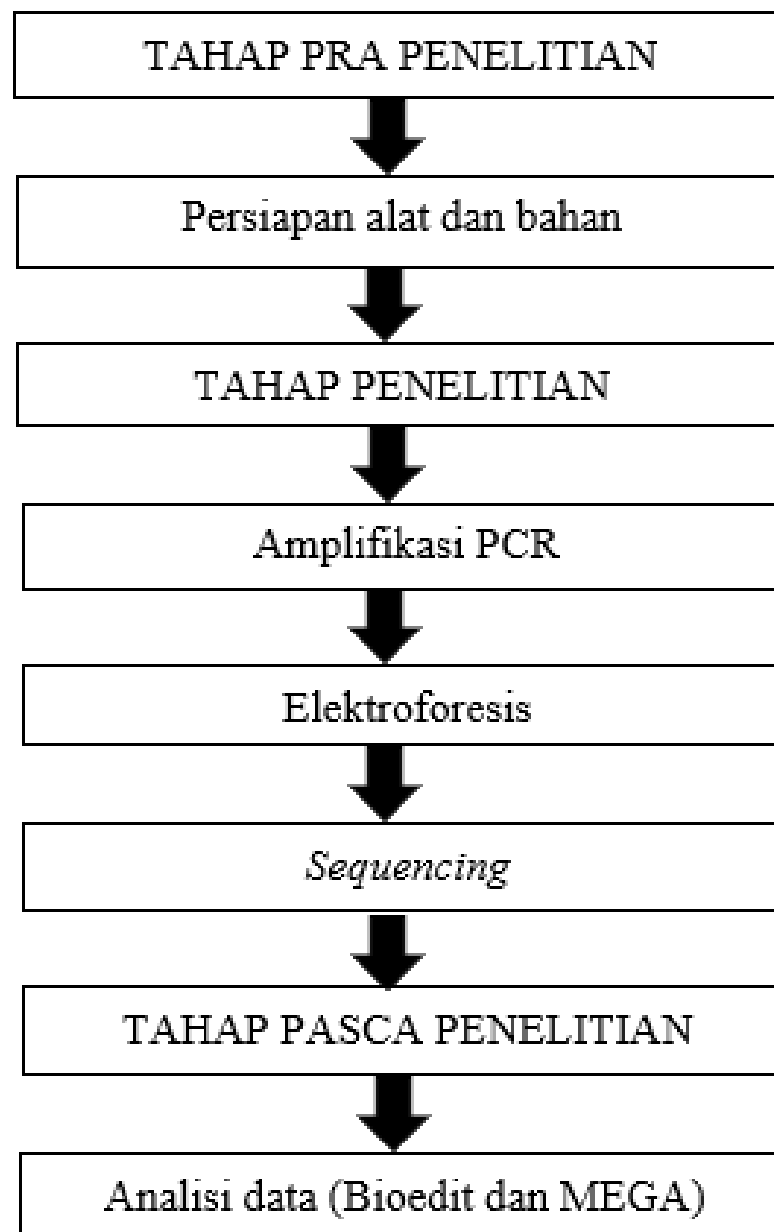
Hasil *contig* sekuens gen HSP70 ayam kate dilakukan analisis dengan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) di NCBI. Analisis ini dilakukan untuk melihat nilai homologi sekuens gen HSP70 ayam kate dengan sekuens referensi gen HSP70 *Gallus gallus* yang terdapat di GeneBank NCBI, dengan cara mengunggah konsensus yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya.

3.6.3 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)

Hasil *sequencing* DNA ayam kate di *alignment* melalui pendekatan ClustalW dengan Gen HSP70 ayam dari referensi NCBI J02579, AY143691, AY143692, dan AY143693 menggunakan software MEGA versi 10 setelah mendapatkan hasil *contig* dari *software* Bioedit.

3.7 Alur Penelitian

Berikut merupakan alur dari penelitian yang dilakukan. Alur penelitian disajikan dalam bentuk diagram pada Gambar 3. 1.



Gambar 3. 3 Diagram Alur Penelitian